



PCT/FR2004/000775

REÇU 22 JUL. 2004

OMPI PCT

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 31 MARS 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 07 / 210502

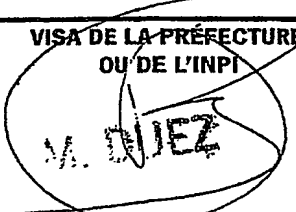
<b>REMARQUES</b> DATE: 28 MARS 2003 LIEU: 69 INPI LYON N° D'ENREGISTREMENT: 0303877 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI: 28 MARS 2003		<b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> Cabinet GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> KH/ACH/BR041812			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Procédés immunochromatographiques en phase solide			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		VEDALAB	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	ZAT du Londreau Rue de l'Expansion - CERISE	
	Code postal et ville	61000 ALENCON	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMB. des frais  
DATE **28 MARS 2003**  
LIEU **69 INPI LYON**  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0303877

DS 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s) (facultatif)</b>			
Nom	DIDIER		
Prénom	Mireille		
Cabinet ou Société	Cabinet GERMAIN & MAUREAU		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	BP 6153	
	Code postal et ville	69 04 16 16 LYON CEDEX 06	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)	04 72 69 84 30		
N° de télécopie (facultatif)	04 72 69 84 31		
Adresse électronique (facultatif)	mireille.didier@germainmaureau.com		
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Mireille DIDIER CPI 971202		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

La présente invention concerne un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide.

Les tests immunochromatographiques en phase solide sont bien connus de l'homme du métier. Ces tests mettent en œuvre un support solide poreux au sein duquel l'échantillon et les réactifs migrent par diffusion capillaire. On connaît notamment les dispositifs dans lesquels le support solide se présente sous la forme d'un « dip-stick ». Ces tests utilisent un support solide chromatographique comportant une zone de détection sur laquelle est immobilisé un réactif de capture spécifique de l'analyte. Ce support solide est mis en contact avec une solution comprenant d'une part l'échantillon à tester et d'autre part un réactif de liaison marqué spécifique de l'analyte. Cette solution migre par diffusion capillaire dans le support solide jusqu'à la zone portant le réactif de capture immobilisé. Dans un test sandwich, le réactif de liaison marqué se lie à l'analyte alors que ce dernier est immobilisé sur le support solide par le réactif de capture. La présence ou l'absence de l'analyte dans l'échantillon est ainsi mesurée par la détection du réactif marqué.

EP 0 284 232 décrit des tests immunochromatographiques en phase solide dans lesquels le support solide porte directement, sous forme lyophilisée ou déshydratée, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire. Le réactif conjugué avec le marqueur particulaire est immobile sous forme lyophilisée mais devient mobile dans le support solide à l'état humide. Ainsi, lorsque le support solide est mis en contact avec un échantillon liquide, ce dernier migre par diffusion capillaire dans le support entraînant le réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire. Dans ces tests, il n'est pas nécessaire de mélanger préalablement le réactif conjugué et l'échantillon et tous les réactifs nécessaires au test sont donc intégrés au support solide. De plus, le réactif de liaison marqué spécifique de l'analyte est marqué avec un marqueur particulaire détectable par observation directe. Aucune manipulation supplémentaire n'est donc nécessaire pour lire le résultat du test. Ces tests ne nécessitent donc que très peu de manipulations et sont d'un usage facile et rapide.

EP 0 291 194, EP 0 560 411 et EP 0 560 410 décrivent également des dispositifs de test dans lesquels le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire est porté par le support solide. De plus dans ces dispositifs, le support solide est incorporé dans un boîtier pourvu d'une ouverture pour le dépôt de l'échantillon et d'une fenêtre d'observation pour la

lecture des résultats. Le boîtier facilite la préhension du dispositif et protège le support solide. En outre, ces brevets décrivent également des dispositifs dans lesquels l'une des extrémités du support solide est saillante par rapport au boîtier pour faciliter le dépôt de l'échantillon liquide. Cette extrémité saillante du support solide peut ainsi être directement mise en contact avec un flux d'urine par exemple.

WO 00/00288 décrit des dispositifs améliorés comprenant un boîtier et un support solide. Le support solide étant pourvu d'un organe de captation mobile pour une meilleure collecte de l'échantillon.

Cependant, ces tests immunochromatographiques en phase solide présentent parfois une sensibilité et une reproductibilité insuffisantes. Ce problème se pose plus particulièrement pour la détection d'analytes présents à une faible concentration ou par la détection d'analytes dans un échantillon de nature complexe tel que du sang total par exemple. De plus, en raison de ces déficiences de tels tests ne conviennent que pour déterminer l'absence ou la présence d'un analyte dans un échantillon. Des mesures plus quantitatives ne sont que difficilement réalisables. En outre, on observe fréquemment un bruit de fond important ainsi qu'un effet de zone (ou « Hook effect ») qui altèrent la lisibilité du résultat. L'effet de zone est un effet indésirable bien connu dans les tests immunologiques. Il se produit lorsque l'analyte est présent dans l'échantillon à une concentration très élevée. L'effet de zone peut alors conduire à un résultat négatif concluant de façon aberrante à l'absence de l'analyte dans l'échantillon.

Pour remédier à ces inconvénients la présente invention propose des procédés immunochromatographiques en phase solide permettant d'obtenir une sensibilité et une reproductibilité accrues tout en limitant le bruit de fond et les effets de zone. Les procédés selon l'invention sont particulièrement adaptés à des échantillons de nature complexe tel que du sang par exemple. Etant donné que le bruit de fond est diminué alors que la sensibilité et la reproductibilité sont accrues, les procédés de la présente invention, permettent avantageusement de détecter plusieurs analytes différents de façon simultanée sur le même support. De plus, l'analyte présent dans l'échantillon liquide peut être mesuré et quantifié grâce aux performances des procédés selon l'invention.

Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire est ajouté extemporanément sous forme liquide.

5 Dans un premier mode de réalisation, le procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon l'invention comprend les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

10 b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux:

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire, le réactif étant sous forme liquide,

ii) l'échantillon liquide,

15 c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et de l'échantillon liquide depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

20 d) on observe la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection.

Avantageusement à l'étape b) on dépose l'échantillon liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

25 La présente invention concerne également un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

30 b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux :

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire, le réactif étant sous forme liquide,

ii) l'échantillon liquide,

35 iii) un diluant sous forme liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

5 d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

10 a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux:

15 i) l'échantillon liquide,

ii) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

20 c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

25 Avantageusement, à l'étape b) on dépose le diluant sous forme liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et en amont de l'échantillon liquide par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

30 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.

35 Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

Préférentiellement, le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

Avantageusement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant  
5 d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection du support solide poreux.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le support de préhension est pourvu d'au moins une ouverture permettant respectivement le dépôt de l'échantillon liquide, du réactif de liaison conjugué à un marqueur et,  
10 le cas échéant, du diluant sur la zone de collection du support solide poreux.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection  
15 du support solide poreux ; le support solide poreux étant également pourvu d'une première ouverture permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux de l'échantillon  
20 liquide.

Dans un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulaire se fixe dans la zone de détection  
25 du support solide poreux ; le support de préhension étant également pourvu d'une première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et de l'échantillon, et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide  
30 poreux du diluant sous forme liquide.

Préférentiellement, le support de préhension est constitué d'un boîtier.

La présente invention a aussi pour objet un kit de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant a) un support solide poreux  
35 pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de



capture étant immobilisé dans la zone de détection, et b) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire sous forme liquide.

Avantageusement, le kit de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon l'invention comprend en outre un diluant.

5 De préférence, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension.

Préférentiellement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation pour observer la zone de détection du support solide poreux.

10 Dans un mode de réalisation préféré, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une ouverture pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire et/ou du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

15 Préférentiellement, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension en forme de boîtier.

Par « analyte », on entend toute entité chimique, biochimique ou biologique que l'on souhaite détecter dans un échantillon. Parmi les analytes détectés par les procédés selon la présente invention, on citera notamment les  
20 protéines, les peptides, les anticorps, les hormones, les stéroïdes, les antigènes dérivés d'agents infectieux ou de cellules tumorales, les agents infectieux tels que les bactéries, les virus ou les parasites, les acides nucléiques (ADN ou ARN), les molécules thérapeutiques, les drogues ou encore les antibiotiques.

25 Par « détecter », on entend la détermination de la présence ou de l'absence d'un analyte dans un échantillon mais aussi la mesure et la quantification d'un analyte dans un échantillon. En effet, les performances des procédés selon l'invention autorisent la réalisation de mesures quantitatives ou semi quantitatives.

30 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'analyte est la hCG (hormone chorionogonadotropine) ou le PSA (antigène prostatique).

Par « échantillon liquide », on entend tout échantillon dans lequel l'analyte recherché est en solution ou en suspension. Cet échantillon liquide peut notamment être tout fluide biologique ou corporel. L'échantillon liquide  
35 peut également avoir été obtenu directement ou indirectement à partir d'un

fluide biologique ou corporel. L'échantillon peut également être un extrait liquide d'un échantillon solide.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'échantillon liquide est de l'urine, du sang total, du plasma ou du sérum.

5 Les réactifs mis en œuvre dans les procédés selon la présente invention sont bien connus de l'homme du métier.

Le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture sont spécifiques de l'analyte recherché dans l'échantillon.

10 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection du support solide permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.

15 Dans un autre mode de réalisation particulier de l'invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture spécifique de l'analyte immobilisé dans la zone de détection du support solide permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

20 Les tests sandwich et les tests par compétition sont bien connus de l'homme du métier. Dans un test sandwich, le réactif de capture spécifique de l'analyte et le réactif de liaison marqué sont prédéterminés pour se lier respectivement et spécifiquement avec l'analyte, par exemple sur deux sites épitopiques, identiques ou différents de l'analyte. Dans un test par compétition, le réactif de liaison marqué est identique ou analogue à l'analyte, pour se lier avec le réactif de capture, en compétition avec l'analyte.

25 Par « réactif de capture », on entend toute entité chimique biochimique ou biologique susceptible de se lier spécifiquement avec l'analyte.

30 Dans le cas d'un test par compétition, le réactif de capture se lie également au réactif de liaison. L'analyte et le réactif de capture forment typiquement un couple ligand/anti-ligand, antigène/anticorps, ADN/ARN ou ADN/ADN. Ainsi, si l'analyte est un antigène ou un haptène, le réactif de capture est par exemple un anticorps spécifique de l'analyte. Si l'analyte est un anticorps, le réactif de capture est l'antigène reconnu par l'anticorps ou un anticorps reconnaissant spécifiquement l'analyte. Si l'analyte est un acide nucléique, le réactif de capture est par exemple une sonde ADN complémentaire.

Le réactif de capture immobilisé est préférentiellement un anticorps polyclonal ou monoclonal ayant une forte affinité pour l'analyte et plus préférentiellement il s'agit d'un anticorps monoclonal.

5 Le réactif de capture spécifique de l'analyte est immobilisé sur le support solide selon des techniques connues de l'homme du métier. Ce réactif de capture est immobilisé de telle façon qu'il ne soit pas mobile à l'état humide. Cette immobilisation peut s'effectuer par exemple par absorption ou par un couplage covalent.

10 Par « réactif de liaison », on entend toute entité chimique biochimique ou biologique susceptible de se lier spécifiquement avec l'analyte ou avec le réactif de capture en compétition avec l'analyte.

Par « lier » ou « liaison », on entend toute liaison forte, par exemple covalente ou toute liaison faible, par exemple du type antigène/anticorps ou avidine/streptavidine.

15 Le réactif de liaison est par exemple un anticorps, un antigène ou un acide nucléique.

Dans un test par compétition, le réactif de liaison est par exemple l'analyte lui-même ou un analogue approprié de l'analyte. Par analogue approprié de l'analyte, on entend un analogue se liant de manière spécifique au réactif de capture spécifique de l'analyte. Le réactif de liaison marqué est donc l'analyte conjugué à un marqueur particulière ou un analogue de l'analyte conjugué à un marqueur particulière.

20

Dans un test de type sandwich, le réactif de liaison se lie de façon spécifique à l'analyte. Le réactif de liaison marqué est donc par exemple un anticorps spécifique de l'analyte conjugué à un marqueur particulière.

25

Le réactif de liaison est conjugué à un marqueur particulière permettant une mesure ou une observation directe du résultat du test. Le marqueur particulière peut être observé directement lorsqu'il est concentré dans la zone de détection du support solide. La mesure du marqueur particulière peut s'effectuer directement à l'œil nu ou à l'aide d'un appareil de mesure. Cette mesure se fait par une observation directe ne nécessitant pas de manipulation supplémentaire.

30

Les marqueurs particuliers sont bien connus de l'homme du métier. On connaît notamment les marqueurs particuliers colorés ou fluorescents. A titre d'exemple, on citera l'or colloïdal, les particules de latex

35

colorées, les particules de latex fluorescentes et les particules conjugués à l'avidine ou à la streptavidine.

Le réactif de liaison est conjugué au marqueur particulaire selon des techniques connues.

5 Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulaire est sous forme liquide.

Par « réactif sous forme liquide », on entend tout réactif dans lequel le réactif de liaison est en solution ou en suspension. La préparation du réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire sous forme liquide se fait selon  
10 des techniques décrites dans la littérature. Habituellement, le réactif de liaison conjugué est en solution ou en suspension dans une solution saline tamponnée. Cette solution peut également comprendre des agents stabilisants et d'autres composés tels que des anti-bactériens ou des anti-fongiques. Parmi les agents stabilisants on citera par exemple la sérum albumine bovine (BSA)  
15 et la caséine.

Dans certains procédés selon la présente invention, un diluant est utilisé lorsque l'échantillon liquide est du plasma, du sérum ou du sang total par exemple. Ce diluant migre dans le support solide entraînant l'échantillon et le réactif de liaison marqué. Typiquement ce diluant est composé d'une solution  
20 saline tamponnée, il peut également comprendre un détergent ou tout autre composant nécessaire à la réaction.

Les supports solides poreux mis en œuvre dans les tests immunochromatographiques selon l'invention sont bien connus de l'homme du métier (EP 0 284 232). La porosité du support permet la diffusion capillaire de  
25 l'échantillon et des réactifs à l'état liquide ou humide.

A titre d'exemple, le support solide poreux peut être constitué de divers supports chromatographiques, de cellulose, de nylon, de nitrocellulose, de polyéthylène ou de fibre de verre.

Le support solide peut être constitué d'une ou de plusieurs parties  
30 distinctes. Les différentes parties du support pouvant être constitués de matériaux différents. Lorsque le support solide est constitué de différentes parties ou de différents matériaux, ces éléments sont disposés de telle façon à permettre la continuité de l'écoulement capillaire dans le support solide.

De préférence, le support solide poreux est un support solide  
35 poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

Le support solide peut ainsi se présenter sous la forme d'une bande chromatographique constituée de plusieurs bandelettes superposés ou chevauchantes.

Typiquement, le support solide poreux comporte une zone de collection de l'échantillon et une zone de détection portant le réactif de capture. Ces zones sont disposées de façon à permettre la continuité de l'écoulement capillaire depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection. La zone de collection et la zone de détection sont deux zones distinctes et séparées du support solide poreux. L'échantillon, le réactif de liaison marqué et le cas échéant le diluant sont déposés au niveau de la zone de collection et migrent à travers le support solide poreux jusqu'à la zone de détection. Le support solide poreux est ainsi par exemple constitué d'une bande chromatographique dont l'une des extrémités constitue la zone de collection, la zone de détection étant situé à proximité de l'autre extrémité de la bande.

Ces zones peuvent par exemple être présentes dans un même plan sur une bande constitué d'un matériau unique. Avantageusement, un matériau spécifique correspond à chaque zone du support solide. Un matériau absorbant poreux peut par exemple être utilisé pour la zone de collection de l'échantillon.

La zone de collection de l'échantillon du support solide peut ainsi être constitué d'un organe de captation en matériau absorbant. Cet organe de captation peut être directement mis en contact avec un flux d'urine par exemple. Le support solide peut également comprendre un organe de captation mobile tel que décrit dans WO 00/00288.

La zone de détection du support solide poreux peut également comporter un deuxième réactif de capture immobilisé sur le support poreux en aval du premier réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture immobilisé permet de contrôler le bon déroulement du test en vérifiant par exemple la migration du réactif de liaison conjugué au marqueur particulière dans le support solide. Le deuxième réactif de capture est par exemple un anticorps spécifique du réactif de liaison.

Dans les procédés selon la présente invention, le réactif de liaison marqué, l'échantillon et le cas échéant le diluant sont déposés séparément, successivement et sous forme liquide dans la zone de collection du support solide. Le dépôt extemporanée du réactif de liaison marqué sous forme liquide avant l'échantillon et/ou avant le diluant permet de diminuer bruit de fond et

effet de zone tout en augmentant la sensibilité et la reproductibilité des procédés selon l'invention.

De façon avantageuse, l'échantillon ou le diluant est déposé dans la zone de collection en amont du réactif de liaison marqué.

5 Afin de contrôler la quantité de réactif de liaison marqué déposé sur la zone de collection du support solide poreux, ce dépôt s'effectue de préférence à l'aide d'une pipette ou d'un goutte à goutte.

10 L'échantillon liquide peut également être déposé à l'aide d'une pipette ou d'un goutte à goutte. Dans un autre mode de réalisation, le dépôt de l'échantillon est effectué en trempant la zone de collection du support solide dans l'échantillon liquide. Lorsque l'échantillon liquide est de l'urine, la zone de collection du support solide peut aussi être directement mise en contact avec un flux d'urine.

15 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, le support solide poreux est intégré dans un support de préhension. Ce support de préhension peut envelopper partiellement ou totalement le support solide poreux. Habituellement, le support de préhension est en forme de boîtier.

Ces supports de préhension ou boîtiers sont notamment décrits dans EP 0 291 194, EP 0 560 411, EP 0 560 410 et dans WO 00/00288.

20 Le support de préhension facilite la manipulation du support solide poreux et protège celui-ci de l'humidité notamment.

Le support de préhension peut être constitué de matériaux divers tel que du carton, du carton plastifié ou plus préférentiellement de matières plastiques. De façon avantageuse, le support de préhension est constitué d'un  
25 matériau rigide et imperméable.

Typiquement, le support de préhension est pourvu d'au moins une fenêtre d'observation pour observer la zone de détection du support solide poreux.

30 Dans un mode de réalisation de l'invention, le support solide poreux peut comprendre une zone de collection saillante par rapport au support de préhension pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison marqué et/ou du diluant.

35 Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le support de préhension ou le boîtier comprend au moins une ouverture pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison marqué et/ou du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des figures et des exemples ci-dessous :

5                    **Figures**

Figure 1 : Principes des procédés immunochromatographiques de l'invention  
Les régions grisées représentent des parties du support solide constituées d'un matériau absorbant.

10

Figure 2 : Dispositif pour tests immunochromatographiques

La figure 2 représente un dispositif comprenant un boîtier comprenant un support solide poreux. Le boîtier est pourvu d'une ouverture (O) pour le dépôt des liquides et d'une fenêtre d'observation (F). La figure 2a représente le dépôt  
15 des liquides sur le support solide par l'ouverture dans le boîtier. La figure 2b montre un résultat négatif visible par la fenêtre d'observation (F). La figure 2b montre un résultat positif pour un test sandwich visible par la fenêtre d'observation (F).

T= ligne de test, C= ligne de contrôle, O= ouverture, F= fenêtre d'observation.

20

Figure 3 : Dispositif pour tests immunochromatographiques à deux puits

La figure 3 représente un boîtier comprenant un support solide poreux. Le boîtier est pourvu de deux ouvertures distinctes (O1 et O2) pour le dépôt des liquides et d'une fenêtre d'observation (F). La flèche indique le sens de  
25 migration par diffusion capillaire.

O1= ouverture n° 1, O2= ouverture n°2, F= fenêtre d'observation.

Figure 4 : Exemples comparatifs avec diluant

R= réactif de liaison marqué, E= échantillon, D= diluant, T= ligne de test, C=  
30 ligne de contrôle.

Figure 5 : Exemples comparatifs sans diluant

R= réactif de liaison marqué, E= échantillon, T= ligne de test, C= ligne de  
35 contrôle.

## Exemples

### Exemple 1 : Procédés immunochromatographiques avec diluant

#### 5 Dispositif

Les procédés ont été mis en œuvre avec les dispositifs représentés à la figure 2 et à la figure 3.

#### Analyte et échantillon

L'analyte est l'antigène prostatique (PSA) détecté dans du sérum. Le test pourrait être réalisé de la même façon avec du sang total ou du plasma.

#### Réactifs et diluant

Le réactif de liaison marqué est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-PSA conjugué avec de l'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.

15 Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un premier réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-PSA.

Au niveau de la ligne de contrôle de la zone de détection est immobilisé un deuxième réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre l'anticorps du réactif de liaison marqué.

20 Le diluant est constitué d'un tampon PBS (0,1 M, pH 8) contenant un détergent (0,05% Tween 20).

#### Procédés

Les différents procédés qui ont été comparés sont représentés dans la figure 4.

25 Les procédés A, B et C sont conformes à l'invention. Dans tous les cas, la quantité d'échantillon et la quantité de réactif de liaison conjugué au marqueur particulière par test étaient identiques quelle que soit le procédé considéré pour ne pas fausser les résultats.

Volume échantillon = 25  $\mu$ l (Version A, B, C, D, E)

30 Volume diluant = 100  $\mu$ l (Version A, B, C, D), 150  $\mu$ l (Version E).

Volume réactif de liaison marqué = 35  $\mu$ l (Version A, B, C, D), identique mais sous forme déshydratée (Version E).

Les procédés ont été réalisés de la façon suivante :

Version A

- 35
- 1) Réactif de liaison marqué
  - 2) Echantillon



3) Diluant

Version B

1) Echantillon dans ouverture 2

2) Réactif de liaison marqué dans ouverture 2

5 3) Diluant dans ouverture 1 (en amont de l'ouverture 2).

Version C

1) Echantillon

2) Réactif de liaison marqué

3) Diluant

10 Version D

1) Echantillon et réactif de liaison marqué pré-mélangés

2) Diluant

Version E

1) Echantillon

15 2) Diluant

Dans ce dernier procédé le réactif de liaison marqué est directement porté par le support solide.

### Résultats

20 Les performances obtenues pour chacun des procédés ont été mesurées et quantifiées à l'aide d'un réflectomètre. L'effet de zone est évalué en utilisant un échantillon très concentré en analyte.

Procédé	Bruit de fond	Effet de zone	Sensibilité	Reproductibilité
A	4	5	5	4
B	5	3	4	4
C	4	4	3	4
D	4	4	2	4
E	3	2	1	2

Classification de 1 à 5 (1 le moins performant, 5 le plus performant).

## Exemple 2 : Procédés immunochromatographiques sans diluant

### Dispositif

Les procédés ont été mis en œuvre avec les dispositifs représentés à la figure 2 et à la figure 3.

### Analyte et échantillon

L'analyte est l'hormone choriogonadotropine (hCG) détectée dans de l'urine. Le test pourrait être réalisé de la même façon avec du serum ou du plasma.

### Réactifs

Le réactif de liaison marqué est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-hCG conjugué avec de l'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.

Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un premier réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal anti-hCG.

Au niveau de la ligne de contrôle de la zone de détection est immobilisé un deuxième réactif de capture. Ce deuxième réactif de capture est un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre l'anticorps du réactif de liaison marqué.

### Procédés

Les différents procédés qui ont été comparés sont représentés dans la figure 5. Les procédés A et B sont conformes à l'invention. Dans tous les cas, la quantité d'échantillon et la quantité de réactif de liaison conjugué au marqueur particulière par test étaient identiques quelle que soit le procédé considéré pour ne pas fausser les résultats.

Volume échantillon = 100  $\mu$ l (Version A, B, D), 100  $\mu$ l + 35  $\mu$ l (Version E)  
Volume réactif de liaison marqué = 35  $\mu$ l (Version A, B, D), identique mais sous forme déshydratée (Version E).

Les procédés ont été réalisés de la façon suivante :

#### Version A

- 1) Réactif de liaison marqué
- 2) Echantillon

#### Version B

- 1) Réactif de liaison marqué dans ouverture 2
- 2) Echantillon dans ouverture 1

#### Version D

- 1) Echantillon et réactif de liaison marqué pré-mélangés

## Version E

## 1) Echantillon

Dans ce dernier procédé le réactif de liaison marqué est directement porté par le support solide.

5 Résultats

Les performances obtenues pour chacun des procédés ont été mesurées et quantifiées à l'aide d'un réflectomètre. L'effet de zone est évalué en utilisant un échantillon très concentré en analyte.

Procédé	Bruit de fond	Effet de zone	Sensibilité	Reproductibilité
A	4	4	4	4
B	5	5	1	4
D	3	1	5	4
E	3	3	3	2

10

Classification de 1 à 5 (1 le moins performant, 5 le plus performant).

Exemple 3 : Procédé de détection de la morphine (test compétition)

15 Dispositif

Ce procédé a été mis en œuvre avec le dispositif représenté à la figure 2.

Analyte et échantillon

L'analyte est la morphine détectée dans de l'urine.

Réactifs

20 Le réactif de liaison marqué est un haptène morphine-BSA conjugué à des particules d'or colloïdal dans un tampon (PBS 0,1M, pH 8) contenant de la sérum albumine bovine (BSA 1%) comme stabilisant.

Au niveau de la ligne de test de la zone de détection est immobilisé un réactif de capture. Ce premier réactif de capture est un anticorps monoclonal anti-

25 morphine.

Procédé

Dépôt de 35 µl de réactif de liaison conjugué au marqueur particulaire puis dépôt de 150 µl d'urine dans le même puit du boîtier. Lecture des résultats 5 minutes plus tard.

### Résultats

Par rapport à un test mettant en œuvre un support solide portant le réactif de liaison conjugué sous forme déshydratée, le bruit de fond est diminué et la reproductibilité est améliorée.

## REVENDICATIONS

1) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide  
5 comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de  
10 collection du support solide poreux:

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

ii) l'échantillon liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion  
15 capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon liquide depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

20

2) Procédé selon la revendication 1 dans lequel à l'étape b) on dépose l'échantillon liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

25

3) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé  
30 dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux :

i) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

35

ii) l'échantillon liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux,

5 d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

4) Procédé de détection d'un analyte dans un échantillon liquide comprenant les étapes suivantes :

10 a) on dispose d'un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection ;

b) on dépose, séparément et successivement, dans la zone de collection du support solide poreux:

15 i) l'échantillon liquide,

ii) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, le réactif étant sous forme liquide,

iii) un diluant sous forme liquide,

20 c) on attend un temps suffisant pour la migration par diffusion capillaire du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière, de l'échantillon liquide et du diluant depuis la zone de collection jusqu'à la zone de détection du support solide poreux,

d) on observe la mesure dans laquelle le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection.

25

5) Procédé selon l'une des revendications 3 ou 4 dans lequel à l'étape b) on dépose le diluant sous forme liquide en amont du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et en amont de l'échantillon liquide par rapport au sens de migration depuis la zone de collection jusqu' à la zone de détection du support solide poreux.

30

6) Procédé selon l'une des revendications 1-5 dans lequel le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test sandwich.

35

7) Procédé selon l'une des revendications 1-5 dans lequel le réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et le réactif de capture immobilisé dans la zone de détection permettent de détecter l'analyte par un test de compétition.

5

8) Procédé selon l'une des revendications 1-7 dans lequel le support solide poreux est un support solide poreux en forme de bande ou de bandelette chromatographique.

10

9) Procédé selon l'une des revendications 1-8 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection du support solide poreux.

15

10) Procédé selon la revendication 9 dans lequel le support de préhension est pourvu d'au moins une ouverture permettant respectivement le dépôt de l'échantillon liquide, du réactif de liaison conjugué à un marqueur et, le cas échéant, du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

20

11) Procédé selon la revendication 2 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support solide poreux étant également pourvu d'une première ouverture permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux de l'échantillon liquide.

30

12) Procédé selon la revendication 5 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation permettant d'observer la mesure dans laquelle le réactif conjugué à un marqueur particulière se fixe dans la zone de détection du support solide poreux ; le support de préhension étant également pourvu d'une première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support

35

solide poreux du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et de l'échantillon, et d'une deuxième ouverture, en amont de la première ouverture, permettant le dépôt dans la zone de collection du support solide poreux du diluant sous forme liquide.

5

13) Procédé selon l'une des revendications 9-12 dans lequel le support de préhension est constitué d'un boîtier.

10 14) Kit de détection d'un analyte dans un échantillon liquide caractérisé en ce qu'il comprend a) un support solide poreux pourvu d'une zone de collection et d'une zone de détection, un réactif de capture étant immobilisé dans la zone de détection, et b) un réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière sous forme liquide.

15 15) Kit de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon la revendication 14 comprenant en outre un diluant.

20 16) Kit de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon l'une des revendications 14-15 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension.

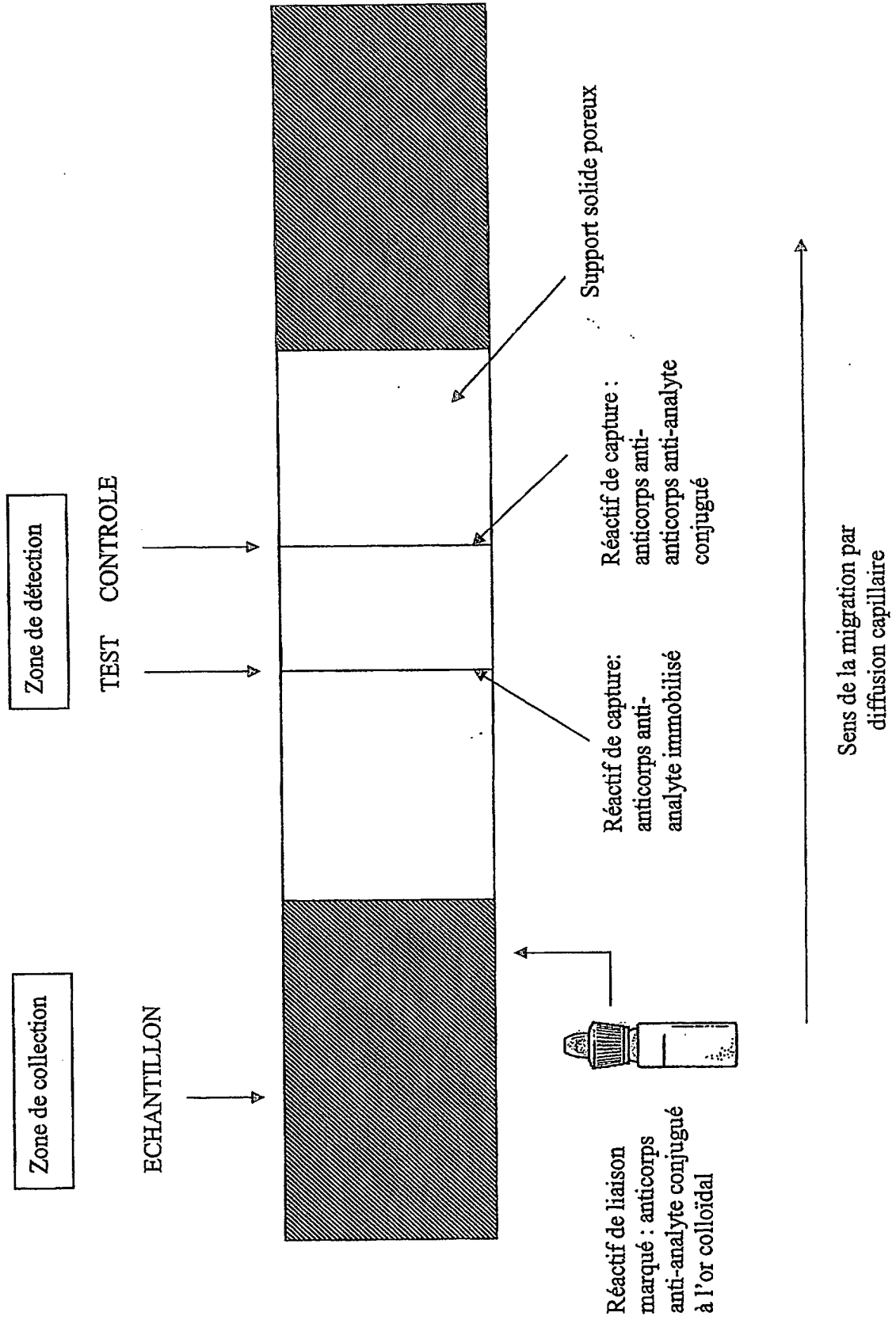
25 17) Kit de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon l'une des revendications 14-16 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une fenêtre d'observation pour observer la zone de détection du support solide poreux.

30 18) Kit de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon l'une des revendications 14-17 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension pourvu d'au moins une ouverture pour le dépôt de l'échantillon liquide et/ou du réactif de liaison conjugué à un marqueur particulière et/ou du diluant dans la zone de collection du support solide poreux.

35 19) Kit de détection d'un analyte dans un échantillon liquide selon l'une des revendications 14-18 dans lequel le support solide poreux est intégré dans un support de préhension en forme de boîtier.



Fig. 1



2 / 5

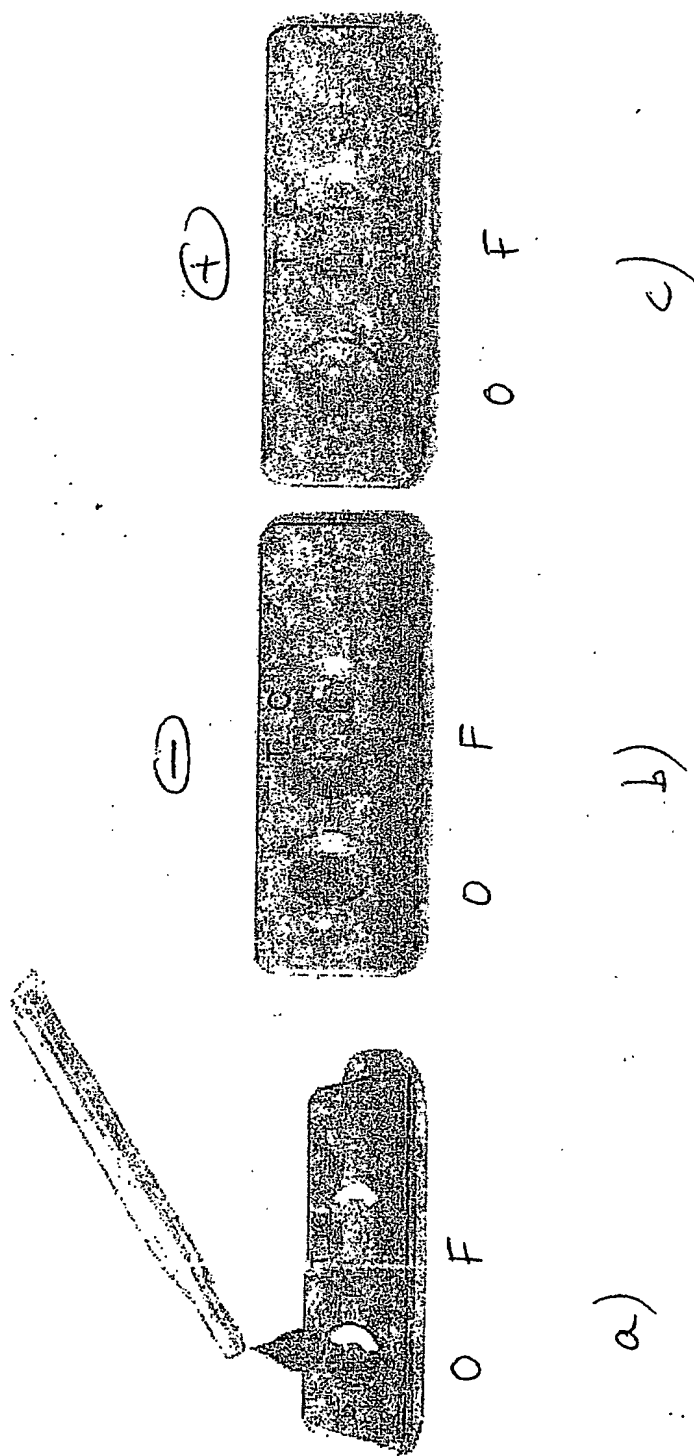
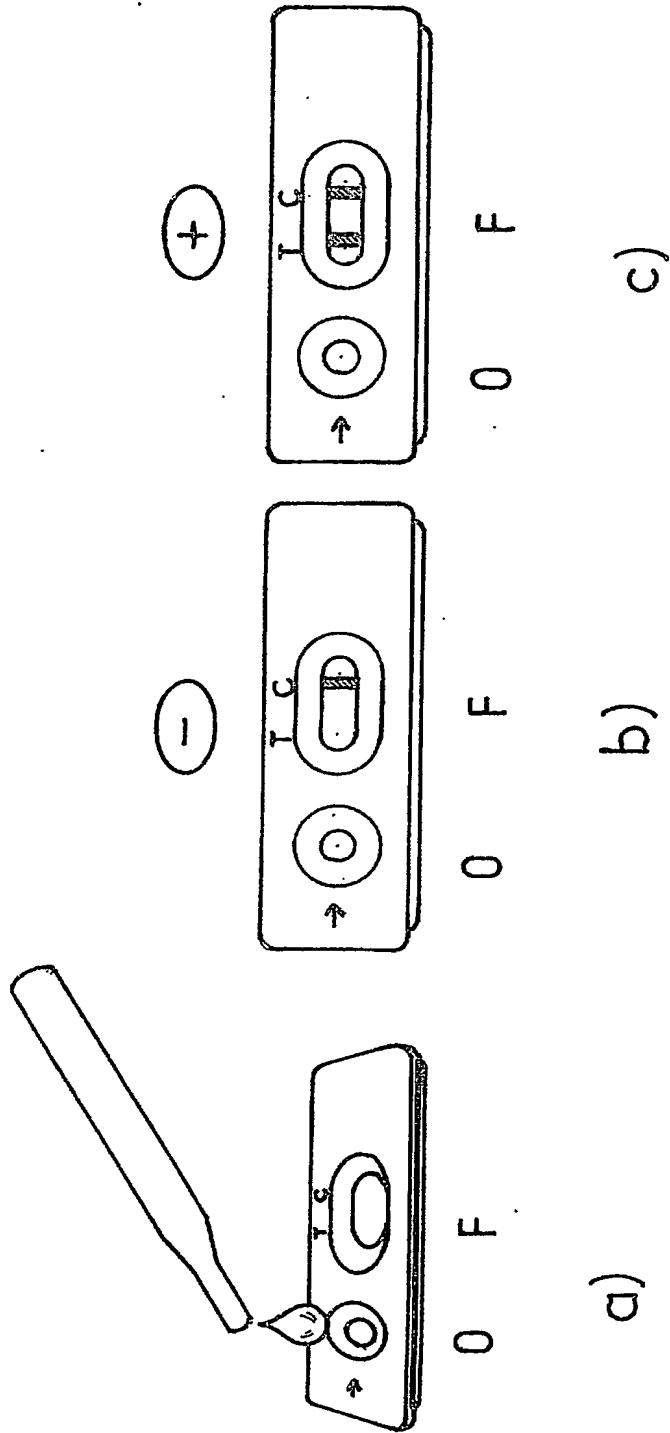


Fig. 2 (dessin provisoire)

FIG 2



3/5

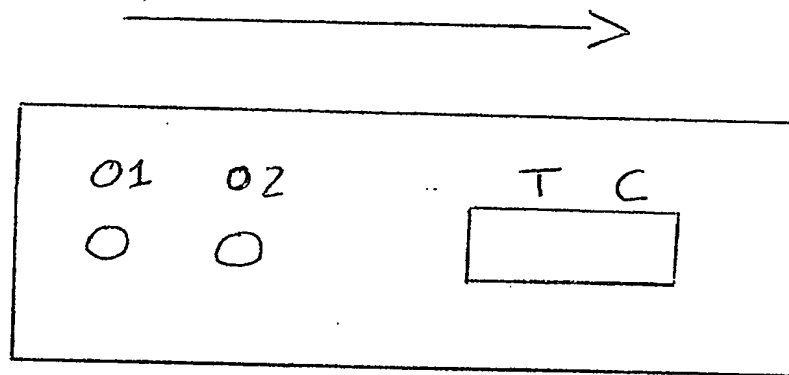


Fig. 3 (dessin provisoire)

3/5

FIG 3

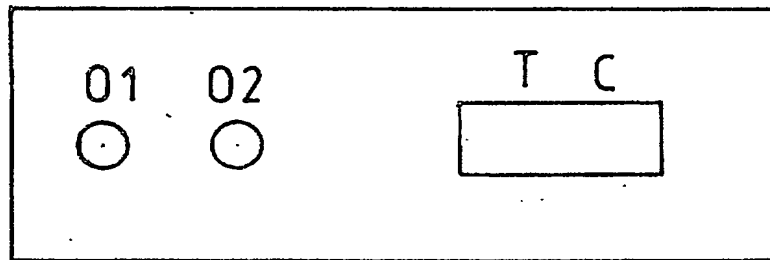


Fig. 4  
(desin provisoic)

4/5

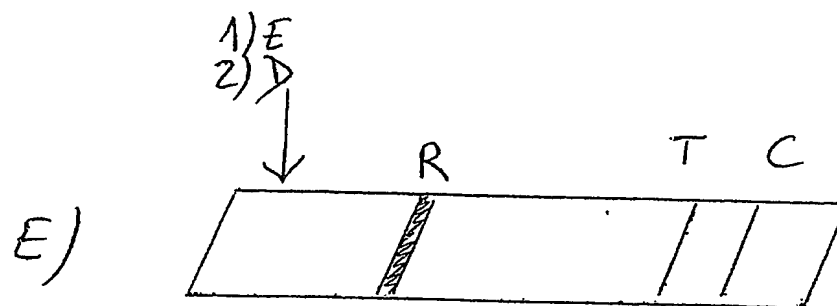
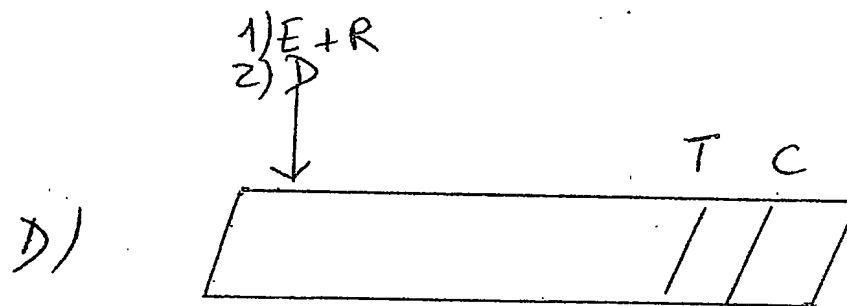
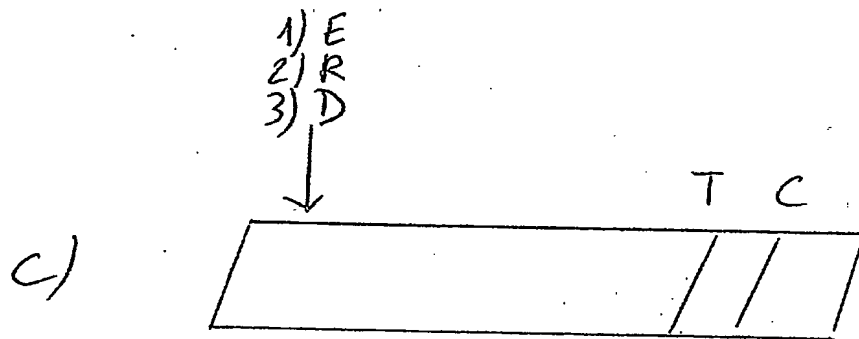
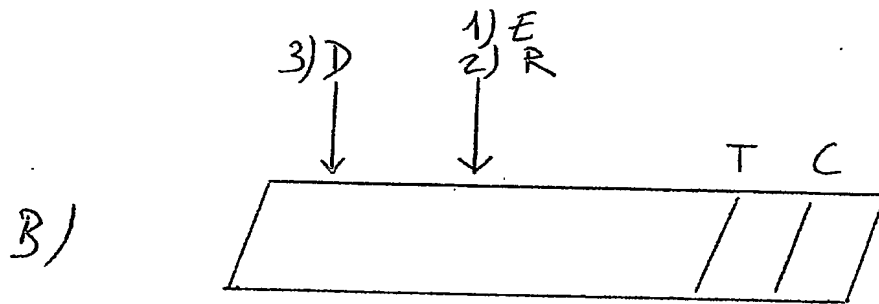
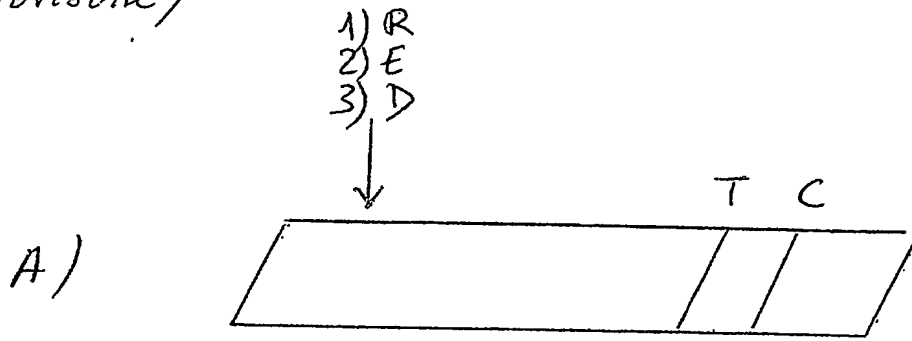
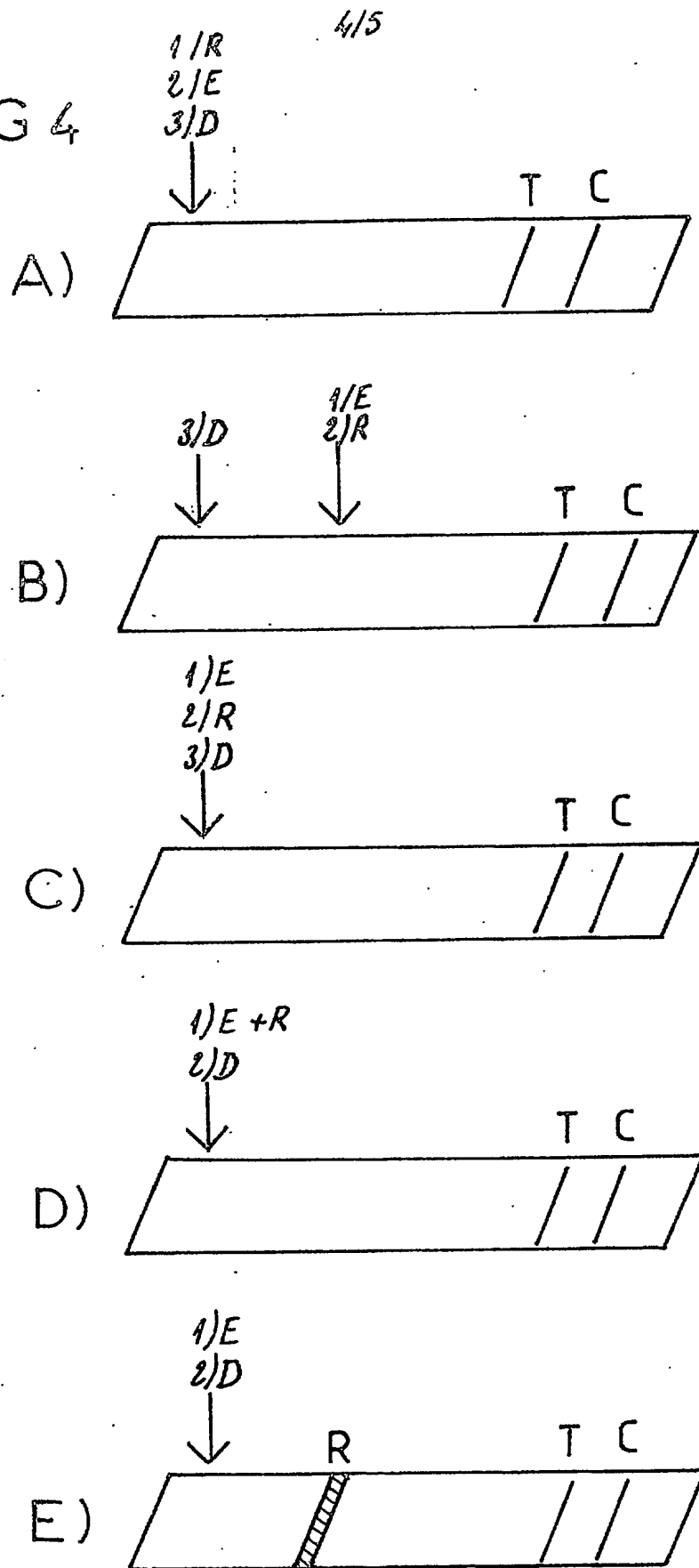


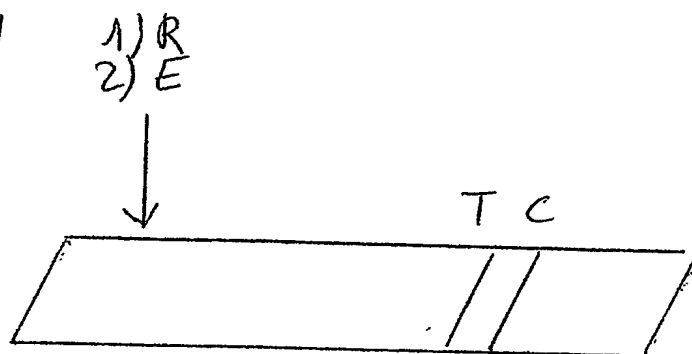
FIG 4



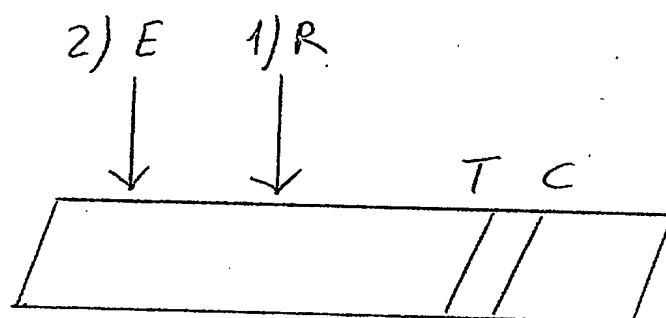
5/5

Fig 5  
(den in provisor)

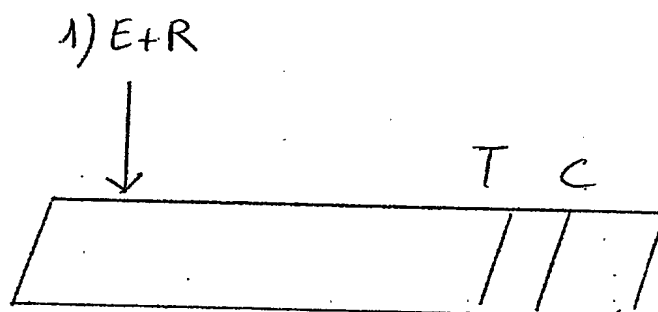
A)



B)



D)



E)

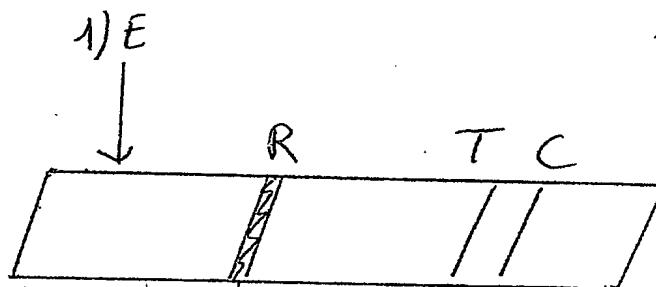
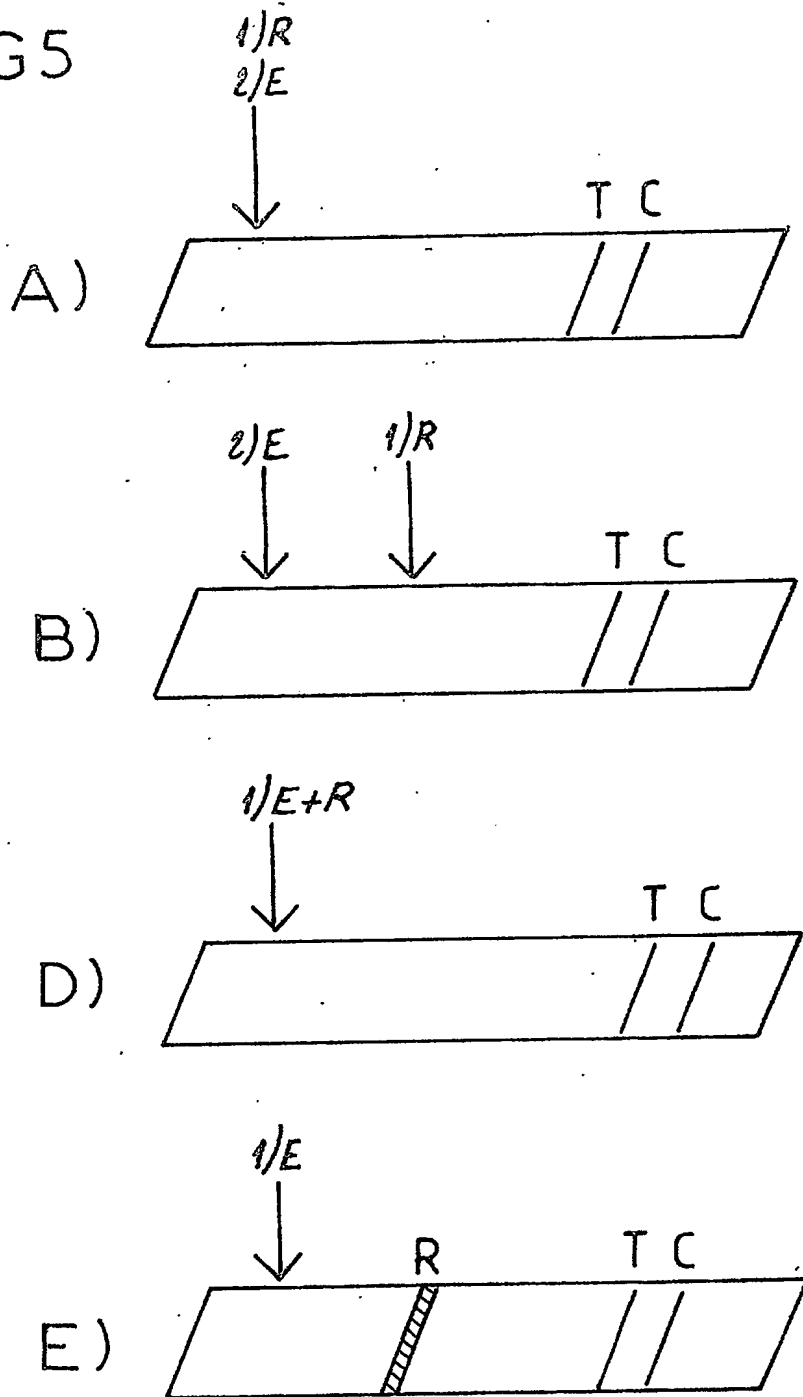




FIG 5





**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11235\*03

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° ... / ...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601



**Vos références pour ce dossier (facultatif)**

KH/ACH/BR041812

**N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL**

0303877

**TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

Procédés immunochromatographiques en phase solide

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**

VEDALAB  
ZAT du Londreau  
Rue de l'Expansion - CERISE  
61000 ALENCON  
FRANCE

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :**

☒ **1** Nom

DONATI

Prénoms

Raphaël

Adresse

Rue

4 rue d'Ecouves

Code postal et ville

161250 RADON

Société d'appartenance (facultatif)

☒ **2** Nom

BIGOT

Prénoms

Patrick

Adresse

Rue

Les Fours à chaux  
Route de Boucé

Code postal et ville

161150 ECOUCHE

Société d'appartenance (facultatif)

☒ **3** Nom

Prénoms

Adresse

Rue

Code postal et ville

Société d'appartenance (facultatif)

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

**DATE ET SIGNATURE(S)**

**DU (DES) DEMANDEUR(S)**

**OU DU MANDATAIRE**

(Nom et qualité du signataire)

Mireille DIDIER

CPI 971202